

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Eishun TSUCHIDA, et al.

SERIAL NO: NEW APPLICATION

FILED: HERewith

FOR: ZWITTERIONIC LIPID COMPOUND AND USES THEREOF

**REQUEST FOR PRIORITY**

COMMISSIONER FOR PATENTS  
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- ☒ Full benefit of the filing date of International Application No. PCT/JP02/08419, filed August 21, 2002, is claimed pursuant to the provisions of **35 U.S.C. §120**.
- ☐ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of **35 U.S.C. §119(e)**:  
Application No. Date Filed
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of **35 U.S.C. §119**, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

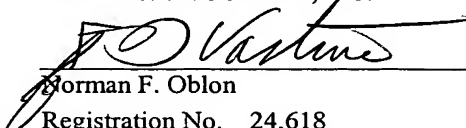
<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	2001-254733	August 24, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)  
☐ are submitted herewith  
☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

  
Norman F. Oblon  
Registration No. 24,618

Customer Number

**22850**

Tel. (703) 413-3000  
Fax. (703) 413-2220  
(OSMMN 05/03)

Frederick D. Vastine  
Registration No. 27,013

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2001年 8月24日

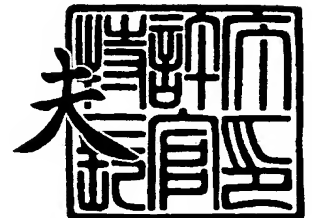
出願番号  
Application Number: 特願2001-254733  
[ST. 10/C]: [JP2001-254733]

出願人  
Applicant(s): 株式会社 オキシジェニクス

2003年 9月 2日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井 康夫



出証番号 出証特2003-3071685

【書類名】 特許願

【整理番号】 A000104676

【提出日】 平成13年 8月24日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07C101/00  
C07G 69/34

【発明の名称】 両イオン性脂質およびその用途

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 東京都練馬区関町南 2 丁目 1 0 番 1 0 号

【氏名】 土田 英俊

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区大久保三丁目 4 番 1 号 学校法人早稲田大  
学理工学部内

【氏名】 武岡 真司

【発明者】

【住所又は居所】 広島県大竹市立戸三丁目 1 2 番 8 号

【氏名】 宗 慶太郎

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区すすき野 2 丁目 3 番 4 号 3 0 1  
号室

【氏名】 森 かつら

【特許出願人】

【識別番号】 899000068

【氏名又は名称】 学校法人 早稲田大学

## 【代理人】

【識別番号】 100058479

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴江 武彦

【電話番号】 03-3502-3181

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100084618

【弁理士】

【氏名又は名称】 村松 貞男

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100068814

【弁理士】

【氏名又は名称】 坪井 淳

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100092196

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 良郎

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100091351

【弁理士】

【氏名又は名称】 河野 哲

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100088683

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 誠

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011567

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

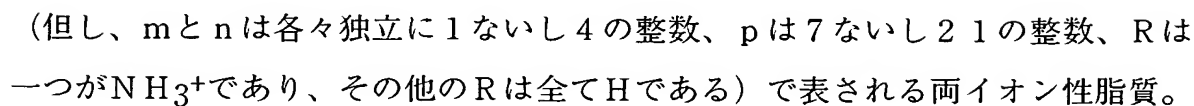
【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

### 【特許請求の範囲】

【化 1】



【請求項3】 mが3、nが2であり、末端カルボキシル炭素から数えて4の炭素のRがNH<sub>3</sub><sup>+</sup>であり、その他のRがHである請求項1に記載の両イオン脂質。

【請求項4】 請求項1ないし3のいずれか1項に記載の両イオン性脂質を、疎水性物質と水性媒体が接触する界面に配向させて、該疎水性物質の表面を親水性表面に改質することを特徴とする表面改質方法。

【請求項5】 請求項1ないし3のいずれか1項に記載の両イオン性脂質を水溶性薬物と共に水性媒体に分散させて形成される小胞体からなる水溶性薬剤の運搬体。

【請求項6】 請求項1ないし3のいずれか1項に記載の両イオン性脂質を40～100モル%含有する脂質の膜で構成されており、内水相に水溶性薬剤が内包され、水性媒体に分散している粒子径100～300nmの小胞体からなる水溶性薬剤の運搬体。

【請求項7】 内水相に10～40 g/dLのヘモグロビンが内包された請求項6に記載の運搬体。

## 【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

**【発明の属する技術分野】**

本発明は、簡便に合成され、生体適合性、生分解性の高い両イオン性脂質、並びにその優れた分子集合特性を利用した表面改質剤、分散安定化剤、薬物運搬体、酸素運搬体としての用途に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

小胞体を形成する両イオン性脂質としては、例えばジアシルグリセロホスホコリンなどのコリン型リン脂質が広く用いられている。両イオン性脂質は、極性頭部間での静電的相互作用により安定な二分子膜を形成することが知られており、小胞体膜の主成分として利用されている。

**【0003】**

小胞体の物理化学的、生理学的性質は、膜構成脂質の親水基の性質が反映される。このため、ポリエチレングリコールや糖質を親水部に有する脂質を任意の割合で混合すると血中滞留時間が変動し、また、各種糖質、抗体、蛋白質、オリゴペプチドなどを小胞体表面に担持させ、特定部位への集積能を高めることもできる。しかし、何れもコリン型リン脂質を主成分とする小胞体を用いられており、適当な代替脂質は実用されていない。

**【0004】****【発明が解決しようとする課題】**

飽和型リン脂質は、原料が高価、合成が煩雑、しかもカラムを用いる精製が不可欠であるため、非常に高価であり、これを生体投与を目的とする小胞体の膜主成分として用いる場合、抗がん剤など僅かな投与量で高価な薬物の運搬体の使用に限定されている。しかし、コリン型リン脂質の様な二本鎖の両イオン性脂質は安定な分子集合体を形成するので、簡便な方法で安価に大量合成できるになれば、酸素運搬体などの大量生体投与剤に留まらず、食品、化粧品、トイレタリー、染料などの多種領域への用途が期待できる。

**【0005】****【課題を解決するための手段】**

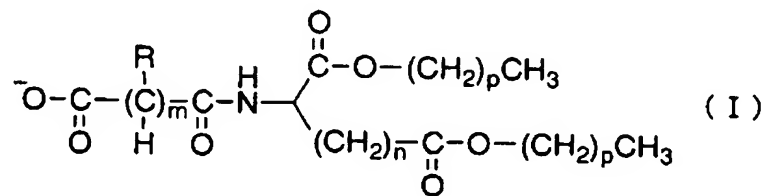
本発明者らは上記実状に鑑み鋭意研究を行った結果、アミノ基およびカルボキ

シル基を親水部に有する二本鎖の両イオン性脂質の合成に成功した。合成は極めて簡便であり、精製工程は溶解性の相違を利用するため、カラム精製を用いる必要はなく、収率高く大量に供給できる。この両イオン性脂質が水性媒体中で安定な二分子膜小胞体を形成し、また内相に水溶性物質を高効率で内包できる。

## 【0006】

すなわち、本発明によれば、下記式

## 【化2】



(但し、mとnは各々独立に1ないし4の整数、pは7ないし21の整数、Rは一つがNH<sub>3</sub><sup>+</sup>であり、その他のRは全てH)で表される両イオン性脂質が提供される。

## 【0007】

## 【発明の実施の形態】

以下に本発明を詳細に説明する。

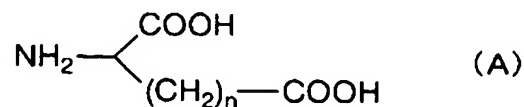
## 【0008】

式(I)で示される本発明の両イオン性脂質は、以下のようにして合成することができる。

## 【0009】

まず、式(A)：

## 【化3】



## 【0010】

(ここで、nは、式(I)と同じ)で示されるアミノ酸を式(B)：



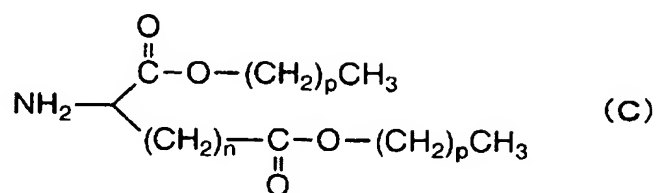
## 【化4】



## 【0011】

(ここで、各  $p$  は、式 (I) と同じ) で示される長鎖アルコールと反応させて、式 (C) :

## 【化5】



で示されるアミノ酸の長鎖アルキルエステルを合成する。

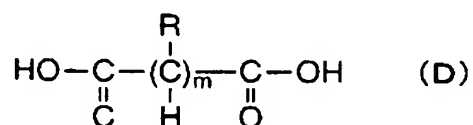
## 【0012】

式 (A) で示されるアミノ酸と式 (B) で示される長鎖アルコールとの反応は、酸触媒による脱水縮合、活性エステル法、酸無水物法、混合酸無水物法等を用いて行うことができる。その中でも、酸触媒による脱水縮合が最も簡便であり、精製も容易であるので好ましい。但し、酸触媒による脱水縮合では加熱を必要とするため、原料が加熱に対して不安定な場合は、他の方法を選択する。

## 【0013】

他方、式 (D)

## 【化6】



## 【0014】

(ここで、 $m$  および  $R$  は、式 (I) と同じ) で示されるアミノ酸を準備し、そのアミノ基と一方のカルボキシル基を常法により保護する。次に、このアミノ基およびカルボキシル基保護アミノ酸を式 (C) で示されるアミノ酸長鎖アルキルエステルと反応 (アミド結合生成反応) させた後、アミノ基およびカルボキシル基

の保護基を除去することによって、式 (I) で示される本発明の両イオン性脂質を得ることができる。

#### 【0015】

上記アミノ基およびカルボキシル基保護アミノ酸と式 (C) で示されるアミノ酸長鎖アルキルエステルとの反応は、活性エステル法、酸無水物法、混合酸無水物法等を用いて行うことができる。また、通常のペプチド合成と同様の方法で固相合成を行うこともできる。

#### 【0016】

本発明の両イオン性脂質の上記合成方法は、簡便であり、収率高く目的の両イオン性脂質を供給することができる。また、合成された両イオン性脂質の精製も溶媒に対する溶解度の差を利用して行うことができ、カラム精製を用いる必要はない。

#### 【0017】

なお、原料としてのアミノ酸が不斉炭素を有する場合、D体、L体、およびD体とL体を任意の割合で含む混合物の何れを用いても合成は同様の方法で実施できる。用途に応じて光学異性体純度の高い両イオン性脂質が要求される場合は、光学異性体純度の高いD体かL体が原料として好ましい。また、生成物を光学異性体分離カラムなどで分離してもよい。

#### 【0018】

本発明の両イオン性脂質は親疎水界面に接触するとその疎水基を疎水性表面に、両イオン性基を水性媒体に向けて配向するため、疎水性表面を親水性表面に改質させることができ、分離用充填剤、各種センサー、細胞培養基板等の表面改質剤として利用できる。また、医薬品、食品、香粧品、トイレタリー、染料等にも使用される薬剤の乳化剤、安定剤、分散剤、可溶化剤、混和剤、湿潤剤、浸透剤、粘度調整剤などとして利用できる。

#### 【0019】

本発明の両イオン性脂質は、水性媒体に単独、あるいはコレステロールやその他の両親媒性分子と混合させて分散させることにより、疎水部間の疎水性相互作用、両イオン性基間の静電的相互作用により分子充填状態が高く、安定な分子集

合体（ミセル状、繊維状、平板状、ロール状、小胞体など）を形成する。安定な二分子膜小胞体（リポソーム）を形成する場合、例えば内水相に水溶性薬剤を内包させることができ、あるいは膜表面に認識部位を担持させることができるので、薬物輸送システムに利用できる。特に、ヘモグロビンを内包させる場合、酸素運搬体として利用できる。

#### 【0020】

本発明の両イオン性脂質を小胞体の膜主成分として利用する場合、その他の膜成分としてはステロール類を安定化剤として添加してもよい。このようなステロール類としては例えば、エルゴステロール、コレステロール等が挙げられるが、好ましくはコレステロールである。コレステロールの含有量に制限はないが、小胞体膜の安定度を考慮すれば5～50モル%、好ましくは20～50モル%である。膜成分中に負電荷脂質を混合させることで小胞体凝集が抑制され被覆層数が減少して内包効率が增大するので、負電荷脂質を成分として添加してもよい。負電荷脂質としてはジアシルホスファチジルグリセロール、ジアシルホスファチジン酸、ジアシルホスファチジルイノシトール、ジアシルホスファチジルセリン、脂肪酸、カルボン酸型脂質が使用でき、含有量は1～50モル%であり、特に5～20モル%が望ましい。ポリエチレングリコール型脂質の導入により小胞体凝集が大幅に抑制され、投与後の血中滞留時間が增大するので、これを膜成分として添加してもよい。混合脂質中に0.01～5モル%のポリエチレングリコール型脂質を混合させる場合が有効であるが、好ましくは0.1～1モル%である。0.1モル%より少ない場合は凝集抑制効果が弱くなり、また1モル%より多い場合は小胞体内相に伸びたポリエチレングリコール鎖の排除体積効果により封入効率が低下する。ポリエチレングリコールの分子量は2,000～12,000程度が好ましい。

#### 【0021】

水性媒体としては純水、生理食塩水、各種緩衝液、あるいはこれらの水性媒体に水溶性薬剤を溶解させた溶液を用いる。水性媒体のpHは酸性ではカルボン酸アニオンはカルボン酸となり、アルカリ性ではアンモニウムがアミンとなって両イオン性ではなくなるが、表面電荷を制御する必要がある場合やそれによって特

に安定性の低下や集合形態の変化などに支障が無い場合は pH の制限はない。また、pH の変化による集合形態の変化を逆に利用して内包物の放出や凝集による分離を目的とする場合には、目的に応じた pH であれば良い。小胞体の粒子径は、例えば混合脂質粉末に水性媒体を加えて水和、膨潤させ、静置水和法、ボルテックスミキサー、強制攪拌機、超音波照射機、ホモジナイザー、マイクロフルイダイザー、高圧押出機（エクストルーダー）、凍結融解などにより行うことができる。特に、凍結融解と高圧押出機を組み合わせることにより、フィルターの透過性が著しく向上するため、処理時間が短縮、収率が向上する。内包されなかった水溶性薬剤はゲルろ過や超遠心分離や限外ろ過膜処理により内包小胞体と分離できる。

#### 【0022】

ヘモグロビン溶液を使用する場合、ヒト由来、ウシ由来の赤血球を常法によって溶血させ、遠心分離や限外ろ過によりストローマ成分のみを除去したストローマフリーヘモグロビン溶液、ヘモグロビンを単離した精製ヘモグロビン溶液、あるいはリコンビナントヘモグロビン溶液で、限外ろ過により 10 g/dL 以上に濃縮したものが使用される。酸素運搬体として充分量の酸素を生体組織に供給するためにはヘモグロビン濃度 20～50 g/dL が好ましい。

#### 【0023】

本発明において、イノシトールリン酸、ピリドキサル 5' リン酸（PLP）などの有機リン化合物をヘモグロビンの酸素親和度調節のために加えてもよい。また、ヘモグロビンの還元剤としてはホモシステイン、グルタチオンなどのチオール類、水溶性ビタミン類などを加えてもよい。活性酸素除去剤としてはカタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼを加えてもよい。

#### 【0024】

##### 【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。なお、以下の実施例における化合物（誘導体）1～5の構造は、最後にまとめて示してある。

#### 【0025】

## 実施例 1

本実施例では、親水部としてグルタミン酸を  $\alpha$  位のカルボキシル基で化合物 1 に結合させた両イオン性脂質 3 を以下のようにして合成した。

## 【0026】

(A) L-グルタミン酸 (2.96 g, 20 mmol)、p-トルエンスルホン酸一水和物 (4.56 g, 24 mmol) を溶媒ベンゼン (150 mL) に溶解させ、生成水を除去しながら 1 時間還流した。ヘキサデシルアルコール (10.65 g, 44 mmol) を加え、105℃で生成水を除去しながらさらに 14 時間還流させた。溶媒を減圧除去した後、残分をクロロホルム (150 mL) に溶解させ、炭酸ナトリウム飽和水溶液 (150 mL) で 2 回、水 (150 mL) で 2 回洗浄した。クロロホルム層を回収し、硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧除去した。残渣をメタノールから 4℃で再結晶、ろ過後乾燥して白色粉末の化合物 1 (9.5 g、収率 80%) を得た。

## 【0027】

化合物 1 の分析結果:

薄層クロマトグラフィー (シリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール (4/1) (容量/容量): Rf: 0.79 (モノスポット))。

## 【0028】

赤外吸収スペクトル ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3385 [ $\nu_{\text{N-H}}(\text{NH}_2)$ ]; 1738 [ $\nu_{\text{C=O}}$  (エステル)]。

## 【0029】

$^1\text{H-NMR}$  スペクトル ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz,  $\delta$  (ppm)): 0.88 (t, 6H,  $-\text{CH}_3$ ); 1.26 (s, 52H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ); 1.62 (m, 4H,  $-\text{CO}-\text{O}-\text{C}-\text{CH}_2$ ); 1.85, 2.08 (m, 2H, glu  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ); 2.46 (m, 2H, glu  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ); 3.46 (m, 1H, glu  $\alpha$ -CH); 4.08, 4.12 (tt, 4H,  $-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-$ )。

## 【0030】

(B) 化合物 1 をアミノ基およびカルボキシル基保護グルタミン酸と以下のようにして結合させた。すなわち、N-t-Boc-L-グルタミン酸  $\alpha$ -t-ブチルエステル (764 mg, 2.52 mmol) と DCC (513 mg, 2.5

2 mmol) をジクロロメタンに溶解し、4℃で30分撹拌した後、化合物1 (1 g、1.68 mmol) とトリエチルアミン (170 mg、1.68 mmol) を溶解したジクロロメタン溶液に滴下する。反応混合溶液を25℃で5時間撹拌した後、ガラスフィルター (G4) で反応液を濾過し、溶媒を減圧除去する。メタノール (300 mL) から4℃で再結晶してろ過後、乾燥して、化合物1に親水部としてアミノ基およびカルボキシル基保護グルタミン酸を結合させた化合物2を白色固体として得た (1.15 g、収率78%)。

#### 【0031】

化合物2の分析結果:

薄層クロマトグラフィー (シリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール (4/1) (容量/容量): R<sub>f</sub>: 0.81 (モノスポット))。

#### 【0032】

赤外吸収スペクトル (cm<sup>-1</sup>): 1737 (ν<sub>C=O</sub> (エステル)); 1665 (ν<sub>C=O</sub> (アミド)); 1570 (δ<sub>N-H</sub> (アミド))。

#### 【0033】

<sup>1</sup>H-NMRスペクトル (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz, δ (ppm)): 0.88 (t, 6H, -CH<sub>3</sub>); 1.26 (s, 52H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1.44、1.46 (s, 18H, CH<sub>3</sub>-C-); 1.62 (m, 4H, -CO-O-C-CH<sub>2</sub>); 1.88-2.25 (m, 4H, glu β-CH<sub>2</sub>); 2.31-2.44 (m, 4H, glu γ-CH<sub>2</sub>); 4.06, 4.14 (t, 4H, -CO-O-CH<sub>2</sub>-); 4.13 (br, 1H, -CH-CONH-); 4.57 (m, 1H, -CH-CO-O-); 5.25 (br, 1H, -O-CO-NH-); 6.90 (d, 1H, amide)。

#### 【0034】

(C) 化合物2 (1.15 g、1.30 mmol) をTFA (10 mL) に溶解し、4℃で3時間撹拌した後、クロロホルム (50 mL) を加え、炭酸ナトリウム飽和水溶液で2回、水で2回洗浄した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧除去した。ベンゼン (10 mL) に溶解後、未溶解成分を濾過して濾液を凍結乾燥し、両イオン性脂質3を白色固体として得た (0.89 g、収率92%)。

#### 【0035】

化合物 3 の分析結果:

薄層クロマトグラフィー (シリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール (4/1) (容量/容量):  $R_f$ : 0.24 (モノスポット))。

【0036】

赤外吸収スペクトル ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1739 ( $\nu_{\text{C=O}}$  (エステル)); 1661 ( $\nu_{\text{C=O}}$  (アミド)); 1567 ( $\delta_{\text{N-H}}$  (アミド))。

【0037】

$^1\text{H}$ -NMR スペクトル ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz,  $\delta$  (ppm)): 0.88 (t, 6H,  $-\text{CH}_3$ ); 1.26 (s, 52H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ); 1.61 (m, 4H,  $-\text{CO}-\text{O}-\text{C}-\text{CH}_2$ ); 1.70-2.20 (m, 4H, glu  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ); 2.32、2.41 (m, 4H, glu  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ); 3.40 (m, 1H,  $-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-$ ); 4.07, 4.12 (t, 4H,  $-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-$ ); 4.51 (m, 1H,  $-\text{CH}-\text{CONH}-$ )。

【0038】

MS (FAB)  $\text{C}_{42}\text{H}_{79}\text{O}_7\text{N}_2\text{Na}$  についての計算値: 746.6; 実測値: 747.7 ( $\text{M}^+\text{H}$ ) +

【0039】

実施例 2

本実施例では、親水部としてグルタミン酸を  $\gamma$  位のカルボキシル基で化合物 1 に結合させた両イオン性脂質 5 を以下のようにして合成した。

【0040】

(A) 化合物 1 をアミノ基およびカルボキシル基保護グルタミン酸とを以下のようにして結合させた。すなわち、 $\text{N-t-Boc-L-グルタミン酸 } \gamma\text{-t-ブチルエステル}$  (382 mg, 1.26 mmol) と DCC (256 mg, 1.26 mmol) をジクロロメタンに溶解し、4℃で30分攪拌した後、化合物 1 (500 mg, 0.84 mmol) とトリエチルアミン (85 mg, 0.84 mmol) を溶解したジクロロメタン溶液に滴下した。反応混合溶液を 25℃で5時間攪拌した後、ガラスフィルター (G4) で反応液を濾過し、溶媒を減圧除去した。メタノール (300 mL) から 4℃で再結晶してろ過後、乾燥して、化合物 1 に親水部としてアミノ基およびカルボキシル基保護グルタミン酸を結合させ

た化合物 4 を白色固体として得た (629 mg、収率 85%)。

【0041】

化合物 4 の分析結果:

薄層クロマトグラフィー (シリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール (4/1) (容量/容量): Rf: 0.84 (モノスポット))。

【0042】

赤外吸収スペクトル ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1737 ( $\nu_{\text{C=O}}$  (エステル)); 1661 ( $\nu_{\text{C=O}}$  (アミド)); 1580 ( $\delta_{\text{N-H}}$  (アミド))。

【0043】

$^1\text{H-NMR}$  スペクトル ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz,  $\delta$  (ppm)): 0.88 (t, 6H,  $-\text{CH}_3$ ); 1.26 (s, 52H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ); 1.44, 1.47 (s, 18H,  $\text{CH}_3-\text{C}-$ ); 1.62 (m, 4H,  $-\text{CO}-\text{O}-\text{C}-\text{CH}_2$ ); 1.86-2.22 (m, 4H, glu  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ); 2.28-2.45 (m, 4H, glu  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ); 4.05, 4.08 (t, 4H,  $-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-$ ); 4.16 (br, 1H,  $-\text{O}-\text{C}-\text{O}-\text{NH}-\text{CH}-$ ); 4.59 (m, 1H,  $-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-$ ); 5.20 (br, 1H,  $-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-$ ); 6.60 (d, 1H, amide)

(B) 化合物 4 (629 mg, 0.71 mmol) を TFA (10 mL) に溶解し、4℃で3時間攪拌した後、クロロホルム (30 mL) を加え、炭酸ナトリウム飽和水溶液で2回、水で2回洗浄した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧除去した。ベンゼン (10 mL) に溶解後、未溶解成分を濾過して、濾液を凍結乾燥し、両イオン性脂質 5 を白色固体として得た (488 mg、収率 92%)。

【0044】

化合物 5 の分析結果:

薄層クロマトグラフィー (シリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール (4/1) (容量/容量): Rf: 0.25 (モノスポット))。

【0045】

赤外吸収スペクトル ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1736 ( $\nu_{\text{C=O}}$  (エステル)); 1650 ( $\nu_{\text{C=O}}$  (アミド)); 1588 ( $\delta_{\text{N-H}}$  (アミド))。

【0046】



$^1\text{H}$ -NMRスペクトル ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz,  $\delta$  (ppm)) : 0.88 (t, 6H,  $-\text{CH}_3$ ) ; 1.26 (s, 52H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ) ; 1.62 (m, 4H,  $-\text{CO}-\text{O}-\text{C}-\text{CH}_2$ ) ; 1.94-2.20 (m, 4H, glu  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ) ; 2.40, 2.41 (m, 4H, glu  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ) ; 3.44 (br, 1H,  $-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-$ ) 4.06, 4.10 (t, 4H,  $-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-$ ) ; 4.47 (br, 1H,  $\text{NH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-$ ) 。

【0047】

MS (FAB)  $\text{C}_{42}\text{H}_{79}\text{O}_7\text{N}_2\text{Na}$ についての計算値: 746.6; 実測値: 747.7 ( $\text{M}^+\text{H}$ ) +

【0048】

実施例3

化合物3 (150mg、0.207mmol)、コレステロール (80mg、0.207mmol)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG) (29mg、0.041mmol)、ポリエチレングリコール結合ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (PEG-DPPEA) (8mg、0.0014mmol)を秤量し、100mLのナス型フラスコに加えた。ここにベンゼン (10mL)を加え加温しながら完全溶解させた。このものをドライアイス-メタノールで凍結して凍結乾燥機に装着し、10時間凍結乾燥した。このものに、DPPGと等モルのNaOHを含む注射用水 (25mL)を添加してマグネットスターラーを用いて攪拌し、均一に水相に分散させた。このものを液体窒素で3分間凍結した後、40℃の恒温槽中に10分間静置して融解させた。この操作を3回繰り返した後、液体窒素で凍結させ凍結乾燥機に装着し、30時間凍結乾燥して白色粉末状の混合脂質粉末を得た。この混合脂質粉末 (50mg)を10mLのナス型フラスコに投入し、濃度40g/dLの一酸化炭素化したヘモグロビン溶液 (5mL)を加えた後、マグネットスターラーを用いて室温で2時間攪拌した。これを口径25φのEXTRUDER (商品名、日油リポソーム製)に加え、加圧 (20kg/cm<sup>2</sup>)しながら孔径3.0μm、0.45μm、0.30μm、0.22μmのアセチルセルロースフィルター (富士写真フイルム製)まで順に通過させた。作成したサンプルについて超遠心分離 (10万g、60分)を3回繰り返し、未内包ヘモグロビンを除去した。人工肺 (Capiox-II)を用い

てこれに高圧ナトリウムランプからの白色光を照射して酸素をガスポートに通過させることにより酸素に配位子交換することが出来る。こうして得たヘモグロビン内包小胞体について市販のコレステロール定量キット及びヘモグロビン定量キットを用いてコレステロール定量、ヘモグロビン (Hb) 定量を行った。コレステロール定量から総脂質重量を求め、ヘモグロビン重量を総脂質重量で除してヘモグロビン／総脂質比を算出した。また、酸素結合解離平衡曲線はHEMOX-ANALYZER (商品名、TCS製) にて測定を行った。得られた値を表1にまとめた。比較として化合物3の代わりにジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) を用いて同様に調製したヘモグロビン小胞体の値を表1に示すが、物性の大きな相違は無く、コリン型リン脂質成分を代替できることが明らかである。

【0049】

【表1】

	本発明	比較例
脂質成分 (モル比)	化合物3／コレステロール／DP PG／PEG-DPPEA： 5／5／1／0.03	DPPC／コレステロール／DP PG／PEG-DPPEA： 5／5／1／0.03
粒径 (nm)	275±12	281±11
Hb濃度 (g/dL)	1.0	1.0
脂質濃度 (g/dL)	5.6	5.9
[Hb]／[脂質]	1.8	1.7
小胞体中還元剤	5mMホモシステイン	5mMホモシステイン
アロステリック因子 (モル比)	PLP／Hb：2.5	PLP／Hb：2.5
メトHb含量 (%)	2.2	2.3
酸素親和度： P50 (Torr)	32	33
酸素運搬効率 (%)	35	37
ヒル係数	2.1	2.1

【0050】

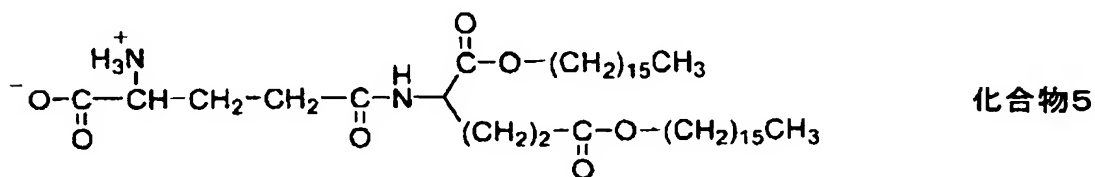
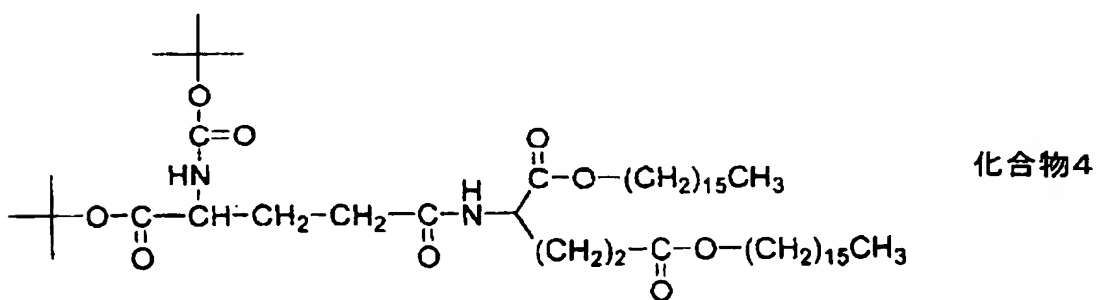
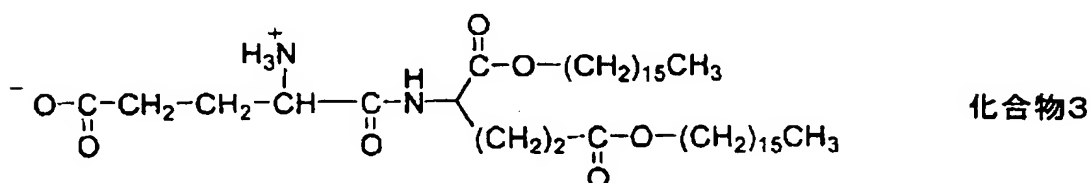
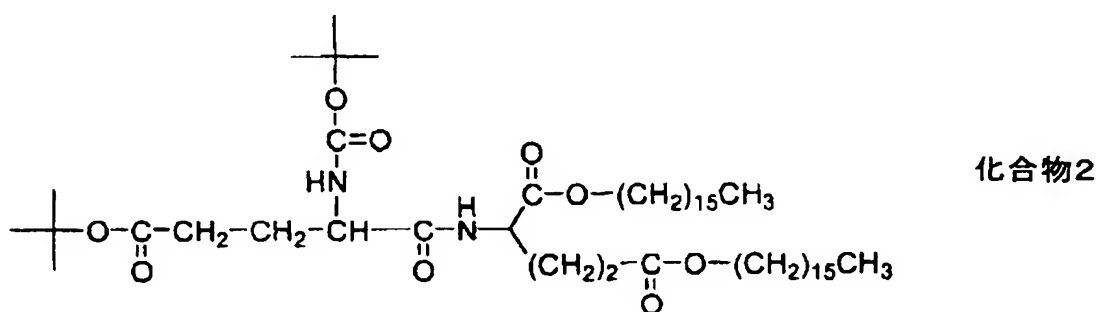
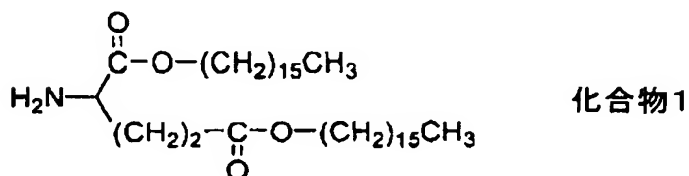
## 実施例4

化合物5をクロロホルムに溶解させ (0.5 mM)、マイクロシリンジにて20  $\mu$ LをLB膜作成装置に充填した水面 (純水) に展開した。バリエーを移動させ、水面圧が25 mN/mになるまで水面を圧縮し (28 cm<sup>2</sup>/min)、単分子膜を作成した。グラファイト基板 (1.5 cm×1.5 cm) をこの水面に接触させ、単分子膜をグラファイト基板表面に吸着させた。シリカゲルを充填したデシケータ内に24時間放置し乾燥させた後、水滴の接触角を測定した。グラファ

イト基板の接触角が  $152^\circ$  であるのに対し、化合物 5 の単分子膜を吸着させた表面では  $32^\circ$  となり、化合物 5 は疎水基をグラファイト側に、両イオン性の親水基を表面側に向け配向し、疎水性グラファイト表面が親水性表面に改質されていることを確認した。

【0051】

【化7】



【0052】

**【発明の効果】**

以上説明したように、本発明によれば、簡便な方法で安価に大量合成できる二本鎖の両イオン性脂質が提供される。

【書類名】 要約書

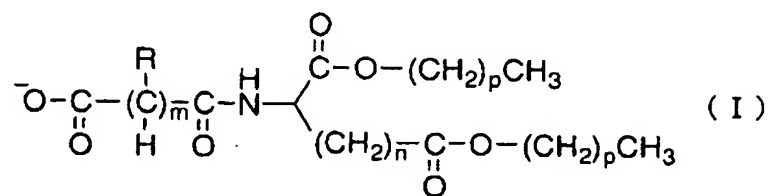
## 【要約】

【課題】 簡便な方法で安価に大量合成できる二本鎖の両イオン性脂質を提供する

○

【解決手段】 式 (I) :

【化1】



(但し、 $m$ と $n$ は各々独立に1ないし4の整数、 $p$ は7ないし21の整数、 $R$ は一つが $\text{NH}_3^+$ であり、その他の $R$ は全て $\text{H}$ である)で表される両イオン性脂質。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届

【整理番号】 AK00104676

【提出日】 平成15年 5月22日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2001-254733

【承継人】

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門四丁目 1 番 1 号

【氏名又は名称】 株式会社 オキシジェニクス

【承継人代理人】

【識別番号】 100058479

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴江 武彦

【電話番号】 03-3502-3181

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011567

【納付金額】 4,200円

【提出物件の目録】

【物件名】 権利の承継を証明する書面 1

【提出物件の特記事項】 手続補足書に添付して提出する。

【物件名】 代理権を証明する書面 1

【提出物件の特記事項】 手続補足書に添付して提出する。

【物件名】 組織変更を証明する書面 1

【提出物件の特記事項】 手続補足書に添付して提出する。

【プルーフの要否】 要



## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2001-254733
受付番号	50300851716
書類名	出願人名義変更届
担当官	兼崎 貞雄 6996
作成日	平成15年 6月30日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【承継人】

【識別番号】	503185437
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門四丁目1番1号
【氏名又は名称】	株式会社 オキシジェニクス

## 【承継人代理人】

申請人	
【識別番号】	100058479
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関3丁目7番2号 鈴榮特許 綜合法律事務所内
【氏名又は名称】	鈴江 武彦

特願 2 0 0 1 - 2 5 4 7 3 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 8 9 9 0 0 0 0 6 8 ]

1. 変更年月日

1 9 9 9 年 9 月 1 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都新宿区戸塚町 1 丁目 1 0 4 番地

氏 名

学校法人早稲田大学



特願 2 0 0 1 - 2 5 4 7 3 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 3 1 8 5 4 3 7 ]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 5 月 2 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都港区虎ノ門四丁目1番1号

氏 名

株式会社 オキシジェニクス